

**POTENSI BAKTERI ENDOSIMBION MANGROVE *Avicennia* sp.  
DI PERAIRAN LAMPUNG SEBAGAI ANTIBAKTERI  
TERHADAP BAKTERI *Salmonella typhi* (Smith, 1885)  
DAN *Staphylococcus aureus* (Ogston, 1880)**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**PANJI MANGGALA PUTRA  
NPM 1714221024**



**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2022**

## ABSTRACT

### THE POTENTIAL OF ENDOSYMBIONTS BACTERIA ISOLATED FROM MANGROVE OF *Avicennia* sp. AS AN ANTIBACTERIA TO *Salmonella typhi* (Smith, 1885) and *Staphylococcus aureus* (Ogston, 1880)

By

PANJI MANGGALA PUTRA

Indonesia as a developing country cannot be separated from various health problems, one of which is diseases related to hygiene and sanitation such as skin infections, diarrhea, meningitis, endocarditis, and pneumonia. The disease is generally caused by *Salmonella typhi* and *Staphylococcus aureus*. Various approaches have been taken to obtain new antibiotic compounds, one of which is to look for bioactive compounds from microorganisms that are in symbiosis with mangroves. This study aimed to isolate endosymbionts of the mangrove *Avicennia* sp. which had antibacterial activity against *S. typhi* and *S. aureus* bacteria and identification of potential by using getically approach. This research found 32 endosymbiont bacteria and 10 them (coded WB-06, WB-08, WB-12, WB-13, PJ-01, PJ-02, PJ-04, PJ-14, PJ-18, and PJ-19) had inhibitory activity against pathogenic bacteria *S. aureus* and *S. typhi*. The isolate performed best antibacterial activity was shown by WB-12 which identified as a *Citromicrobium* sp.

Keywords: *Endosymbiont bacteria*, *antibacteria*, *S. aureus*, *S. typhi*.

## ABSTRAK

### **POTENSI BAKTERI ENDOSIMBION MANGROVE *Avicennia* sp. DI PERAIRAN LAMPUNG SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP BAKTERI *Salmonella typhi* (Smith, 1885) DAN *Staphylococcus aureus* (Ogston, 1880)**

Oleh

**PANJI MANGGALA PUTRA**

Indonesia sebagai negara berkembang tidak terlepas dari beragam masalah kesehatan, salah satunya adalah penyakit yang terkait dengan kebersihan dan sanitasi seperti, infeksi kulit, diare, meningitis, endokarditis, dan pneumonia. Penyakit tersebut umumnya disebabkan oleh *Salmonella typhi* dan *Staphyococcus aureus*. Banyak pendekatan telah dilakukan untuk mendapatkan senyawa antibiotik yang baru, salah satunya adalah dengan mencari senyawa bioaktif dari mikroorganisme yang bersimbiosis dengan mangrove. Penelitian ini bertujuan untuk mencari bakteri endosimbion mangrove *Avicennia* sp. yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. typhi* dan *S. aureus* serta identifikasi bakteri potensial. Identifikasi diawali dengan melakukan uji aktivitas sel dan ekstrak terhadap bakteri patogen. Bakteri potensial dengan aktivitas paling baik diidentifikasi secara molekuler. Hasil dari penelitian ini yaitu didapatkan 32 isolat bakteri endosimbion dan 10 di antaranya dengan kode WB-06, WB-08, WB-12, WB-13, PJ-01, PJ-02, PJ-04, PJ-14, PJ-18, dan PJ-19 memiliki aktivitas daya hambat terhadap bakteri patogen *S. aureus* dan *S. typhi*. Aktivitas terbaik ditunjukkan oleh isolat dengan kode WB-12. Hasil identifikasi isolat WB-12 menunjukkan bahwa bakteri ini merupakan spesies *Citromicrobium* sp.

Kata kunci : bakteri endosimbion, antibakteri, *S. aureus*, *S. typhi*.

**POTENSI BAKTERI ENDOSIMBION MANGROVE *Avicennia* sp.  
DI PERAIRAN LAMPUNG SEBAGAI ANTIBAKTERI  
TERHADAP BAKTERI *Salmonella typhi* (Smith, 1885)  
DAN *Staphylococcus aureus* (Ogston, 1880)**

Oleh

PANJI MANGGALA PUTRA

(Skripsi)

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar  
SARJANA SAINS

Pada

Jurusan Perikanan dan Kelautan  
Fakultas Pertanian Universitas Lampung



FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2022

Judul Skripsi : **Potensi Bakteri Endosimbion Mangrove *Avicennia* sp. di Perairan Lampung sebagai Antibakteri terhadap Bakteri *Salmonella typhi* (Smith, 1885) dan *Staphylococcus aureus* (Ogston, 1880)**

Nama Mahasiswa : **Panji Manggala Putra**

NPM : **1714221024**

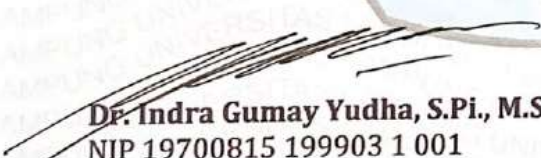
Program Studi : **Ilmu Kelautan**

Jurusan : **Perikanan dan Kelautan**

Fakultas : **Pertanian**

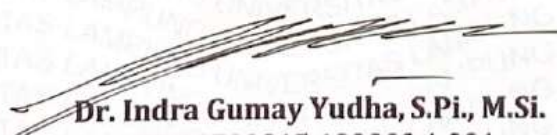


1. Komisi Pembimbing

  
**Dr. Indra Gumay Yudha, S.Pi., M.Si.**  
NIP 19700815 199903 1 001

  
**Oktora Susanti, S.Pi., M.Si.**  
NIP 19881001 201903 2 014

2. Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan

  
**Dr. Indra Gumay Yudha, S.Pi., M.Si.**  
NIP 19700815 199903 1 001

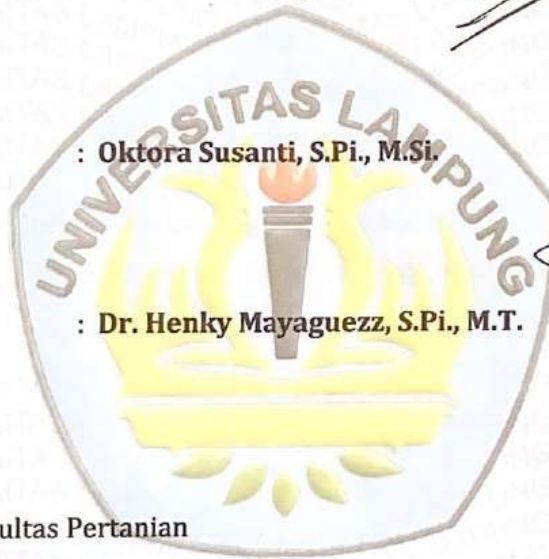
**MENGESAHKAN**

**1. Tim Penguji**

**Ketua : Dr. Indra Gumay Yudha, S.Pi., M.Si.**

**Sekretaris : Oktorita Susanti, S.Pi., M.Si.**

**Anggota : Dr. Henky Mayaguezz, S.Pi., M.T.**



**2. Dekan Fakultas Pertanian**



**Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.**

**NIP. 19611020 198603 1 002**

**Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 17 Januari 2022**

## PERNYATAAN KEASLIAN KARYA

Saya yang bertanda tangan di bawah ini.

Nama : Panji Manggala Putra

NPM : 1714221024

Judul Skripsi : Potensi Bakteri Endosimbion Mangrove *Avicennia* sp. di Perairan Lampung sebagai Antibakteri terhadap Bakteri *Salmonella typhi* (Smith, 1885) dan *Staphylococcus aureus* (Ogston, 1880).

Menyatakan bahwa skripsi yang saya tulis ini adalah murni hasil karya saya sendiri berdasarkan pengetahuan dan data yang saya dapatkan. Karya ini belum pernah dipublikasikan sebelumnya dan bukan plagiat dari karya orang lain. Demikian pernyataan ini saya buat, apabila di kemudian hari terbukti terdapat kecurangan dalam pembuatan karya ini, maka saya siap mempertanggungjawabkannya.

Bandar Lampung, 1 November 2022



Panji Manggala Putra  
NPM 1714221024

## RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Lampung Tengah, tepatnya di Indra Putra Subing pada tanggal 15 Juni 1999, sebagai anak pertama dari 3 bersaudara dari Bapak Samsudin dan Ibu Sugini. Penulis menempuh pendidikan di Taman Kanak-Kanak Yos Sudarso, Bandar Jaya yang diselesaikan pada tahun 2005, pendidikan dasar di Sekolah Dasar Yos Sudarso, Bandar Jaya yang diselesaikan pada tahun 2011, dilanjutkan dengan pendidikan menengah pertama di SMPN 3 Terbanggi Besar yang diselesaikan pada tahun 2014, dan pendidikan menengah atas di SMAN 1 Terbanggi Besar yang diselesaikan pada tahun 2017. Penulis kemudian melanjutkan pendidikan ke jenjang perguruan tinggi melalui jalur SBMPTN di Program Studi Ilmu Kelautan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung pada tahun 2017.

Selama masa kuliah, penulis aktif pada kegiatan organisasi KMB (Korps Muda BEM) Angkatan 13 di tahun 2018 serta Himapik (Himpunan Mahasiswa Perikanan dan Kelautan) sebagai Ketua Bidang Pengembangan Minat dan Bakat pada kepengurusan periode 2019-2020. Beragam prestasi telah diukir oleh penulis baik dalam ajang kompetisi nasional maupun internasional. Beberapa penghargaan yang pernah diraih oleh penulis di antaranya ialah insentif PKM-AI yang diselenggarakan oleh Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi (Ristekdikti) pada 2021, medali perak dari kompetisi internasional IAGC (*International Agritech Great Competition*) pada 2021, juara 3 pada kompetisi LKTI (Lomba Karya Tulis Ilmiah) nasional yang diselenggarakan oleh Universitas Yogyakarta pada 2021, serta pendanaan program Talenta Inovasi yang diselenggarakan oleh Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi (Ristekdikti) pada 2021.



## **PERSEMBAHAN**

### **Bismillahirrahmanirrahim**

Alhamdulillah atas segala nikmat dan berkah, kemudahan, serta izin Allah SWT yang diberikan kepadaku sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini. Kepada kedua orang tuaku yang penuh rasa cinta, kasih dan sayang tanpa batas, kupersembahkan imbuhan kecil di belakang namaku untuk kalian.

Orang tuaku dan adik-adikku tercinta yang tiada henti selalu mendoakan dan tak pernah bosan dalam memberikan semangat, motivasi, menasehati, serta memberi dukungan yang begitu besar sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan di Universitas Lampung dengan lancar.

Teman - teman seperjuangan Jurusan Perikanan dan Kelautan Angkatan 2017, khususnya kelas Ilmu Kelautan '17 yang sangat saya sayangi, dan teman teman di luar Universitas Lampung yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu, yang selalu memberikan motivasi, masukan, dukungan dan semangat kepada penulis.

Serta

Almamaterku tercinta, Universitas Lampung

## SANWACANA

Segala puji bagi Tuhan Yang Maha Esa selalu kami panjatkan, atas segala nikmat dan karunia-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul “Potensi Bakteri Endosimbion Mangrove *Avicennia* sp. di Perairan Lampung sebagai Antibakteri terhadap Bakteri *Salmonella typhi* (Smith, 1885) dan *Staphylococcus aureus* (Ogston, 1880)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat kelulusan dan memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Universitas Lampung.

Dalam penyusunan skripsi ini, penulis banyak mendapat dukungan, bimbingan, serta bantuan dari berbagai pihak. Pada kesempatan kali ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Kedua orang tua dan keluarga, yang selalu memberikan kasih sayang, dukungan, dorongan, serta telah menjadi motivasi bagi penulis untuk menggapai mimpi.
2. Prof. Dr. Irwan Sukri Banuwa, M.Si. selaku Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.
3. Dr. Indra Gumay Yudha, S.Pi., M.Si. selaku Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan dan Dosen Pembimbing I (pengganti).
4. Dr. Henky Mayaguezz, S.Pi., M.T. selaku Ketua Program Studi sekaligus Dosen Pembahas.
5. Dr. Mahrus Ali, S.Pi., M.P.(alm), selaku Dosen Pembimbing I.
6. Oktora Susanti, S.Pi., M.Si. selaku Dosen Pembimbing II.
7. Teman-teman Jurusan Perikanan dan Kelautan Angkatan 2017 yang selalu memberikan senyuman sebagai penyemangat.
8. Semua pihak yang telah banyak berkontribusi baik secara langsung maupun tak langsung dan tidak bisa disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa dalam proses penyusunan skripsi ini terdapat banyak kekurangan dan masih jauh dari kesempurnaan. Meskipun demikian, dalam segala keterbatasan yang ada terdapat usaha dengan penuh rasa bangga, semangat, percaya diri, pantang menyerah, serta niat tulus untuk menyelesaikan skripsi ini. Melalui skripsi ini penulis berharap agar para pembaca dapat menerima informasi dan menambah pengetahuan.

Bandar Lampung, 17 Januari 2022

Penulis



Panji Manggala Putra

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	viii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	ix
<b>I. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan .....	3
1.3 Manfaat Penelitian .....	4
1.4 Kerangka Pikir .....	4
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Mangrove <i>Avicennia</i> sp.....	6
2.2 Mikroba Endosimbion .....	7
2.3 Potensi Senyawa Antibakteri .....	7
2.4 Bakteri Patogen .....	9
2.4.1 <i>Salmonella typhi</i> .....	10
2.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
2.5 Ekstraksi Bakteri .....	11
2.6 Identifikasi Molekuler.....	12
2.7 Teknik Identifikasi Molekuler .....	13
2.7.1 PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) .....	13
2.7.1.1 Denaturasi (Pemisahan) .....	14
2.7.1.2 <i>Annealing</i> (Pelekatan) .....	14
2.7.1.3 <i>Extention</i> (Pemanjangan) .....	14
2.7.2 Elektroforesis .....	15
2.7.3 Sekuensing .....	15
<b>III. METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan Tempat .....	17
3.2 Alat dan bahan .....	17
3.3 Prosedur Penelitian .....	19
3.3.1 Sampling Mangrove.....	19
3.3.2 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	20
3.3.3 Pembuatan Media.....	20
3.3.4 Isolasi Bakteri .....	20

3.3.5 Inokulasi dan Identifikasi Bakteri .....	21
3.3.6 Pemurnian Isolat .....	21
3.3.7 Uji Antagonis .....	22
3.3.8 Identifikasi Makroskopis .....	22
3.3.9 Ekstraksi Bakteri Endosimbion Potensial .....	23
3.3.10 Uji Aktivitas Ekstrak Bakteri Endosimbion Potensial.....	24
3.3.11 Identifikasi Molekuler.....	24
3.3.11.1 Ekstraksi DNA .....	25
3.3.11.2 Amplifikasi PCR ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> ) .....	26
3.3.11.3 Pembuatan Gel Agarose.....	26
3.3.11.4 Elektroforesis .....	27
3.3.11.5 Analisis Data Sekuensing.....	27
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Identifikasi Jenis Mangrove .....	28
4.2 Inventarisasi Isolat Bakteri.....	29
4.3 Uji Daya Hambat Bakteri.....	32
4.4 Profil Bakteri Potensial .....	34
4.5 Uji Daya Hambat Ekstrak Bakteri Potensial.....	35
4.6 Identifikasi Molekuler Bakteri Potensial .....	37
<b>V. KESIMPULAN</b>	
5.1 Kesimpulan .....	40
5.2 Saran.....	40
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>41</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>46</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kerangka pikir penelitian.....	5
2. Diagram alir metode penelitian.....	19
3. Bagian mangrove <i>Avicennia alba</i> .....	28
4. Pohon filogenik isolat genom bakteri .....	37
5. Pengamatan mikroskopis isolat WB-12.....	37
6. <i>Citromicrobium</i> sp. ....	38
7. Pembuatan media. ....	46
8. Pengambilan sampel mangrove .....	46
9. Isolasi sampel daun, batang, akar mangrove.....	46
10. Pemurnian isolat bakteri endosimbion.....	46
11. Uji daya hambat isolat bakteri endosimbion.....	46
12. Uji daya hambat ekstrak bakteri endosimbion.....	46
13. Kultivasi bakteri endosimbion .....	47
14. Ekstraksi (maserasi) bakteri endosimbion potensial.....	47
15. Pemisahan bakteri dari media NB (sentrifugasi) .....	47
16. Pemekatan ekstrak (evaporasi pelarut) .....	47
17. Ekstraksi DNA.....	47
18. PCR dan elektroforesis.....	47
19. Aktivitas isolat WB-08, WB-12, PJ-01, terhadap <i>S. typhi</i> .....	48

20. Aktivitas isolat PJ-02, PJ-4, PJ-14, terhadap <i>S. typhi</i> .....	48
21. Aktivitas isolat WB-06, WB-08, WB-12, WB-13, PJ-01, terhadap <i>S. aureus</i> .....	48
22. Aktivitas isolat PJ-02, PJ-04, PJ-14, PJ-18, PJ-19, terhadap <i>S. aureus</i> ...	48
23. Diagram alir ekstraksi bakteri potensial.....	49
24. Diagram alir identifikasi molekuler WB-12 .....	50
25. WB-06.....	52
26. WB-08.....	52
27. WB-12.....	52
28. WB-13.....	52
29. PJ-01 .....	52
30. PJ-02 .....	52
31. PJ-04 .....	52
32. PJ-14 .....	52
33. PJ-18 .....	52
34. PJ-19 .....	52
35. Peta Way Belau, Kota Karang, Bandar Lampung .....	56
36. Peta Pagar Jaya, Punduh Pidada, Kabupaten Pesawaran .....	56

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Aktivitas biologis senyawa metabolit bakteri endosimbion.....	8
2. Daftar bakteri patogen yang telah mengalami resistensi.....	9
3. Alat yang digunakan .....	17
4. Bahan yang digunakan .....	18
5. Komposisi media <i>Zobell</i> .....	20
6. Kategori diameter zona hambat .....	22
7. Data isolat bakteri dari perairan Way Belau dan Pagar Jaya .....	29
8. Data morfologi isolat bakteri .....	31
9. Hasil uji daya hambat isolat terhadap <i>S. typhi</i> .....	32
10. Hasil uji daya hambat isolat terhadap <i>S. aureus</i> .....	33
11. Profil isolat bakteri potensial .....	34
12. Uji daya hambat ekstrak terhadap <i>S. typhi</i> dan <i>S. aureus</i> .....	35



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Dokumentasi kegiatan pelaksanaan penelitian .....	46
2. Aktivitas daya hambat terhadap bakteri patogen .....	48
3. Prosedur ekstraksi bakteri potensial.....	49
4. Prosedur dentifikasi molekuler isolat bakteri WB-12.....	50
5. Hasil rendemen ekstrak.....	51
6. Identifikasi mikroskopis.....	52
7. Uji DMRT ( $P < 0,05$ ) daya hambat ekstrak isolat potensial terhadap <i>S. typhi</i> dan <i>S. aureus</i> .....	53
8. Lokasi pengambilan sampel Way Belau dan Pagar Jaya.....	56

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia sebagai negara berkembang tidak terlepas dari beragam masalah kesehatan. Beberapa kasus di antaranya adalah penyakit yang berkaitan dengan kebersihan dan sanitasi seperti, infeksi kulit, diare, meningitis, endokarditis, serta pneumonia. Penyakit tersebut umumnya disebabkan oleh *Salmonella typhi* dan *Staphyococcus aureus*.

Diare merupakan suatu kondisi dimana frekuensi buang air besar lebih dari tiga kali dalam sehari dengan bentuk feses yang lembek ataupun cair (Kemenkes, 2014). Penyakit ini merupakan salah satu penyebab kematian utama pada balita (WHO, 2009; Kemenkes RI, 2014), dengan tingkat insidensi sebesar 3,5% dan prevalensi sebesar 7% (Kemenkes RI, 2014). Penyakit lain yang mempunyai gejala berupa diare disertai demam, perut kembung, badan terasa lemah, mual, pusing dan muntah adalah demam tifus (tifoid) (Pelczar and Chan, 2005). Feses yang keluar karena diare akibat demam tifus biasanya disertai darah dan terjadi pada minggu kedua selama periode sakit ataupun penyembuhan (WHO, 2009; Pelczar dan Chan, 2005). Penyebab utama penyakit diare dan demam tifoid adalah bakteri patogen. Salah satu jenis bakteri penyebab diare dan demam tifoid adalah *Salmonella typhi* (Sari *et al.*, 2015).

Demam tifoid sering terjadi di berbagai negara di dunia dan umumnya terjadi di negara berkembang dengan tingkat kebersihan rendah (Kasuku, 2017). Berdasarkan data WHO (*World Health Organisation*), insiden demam tifoid di seluruh dunia sekitar 11-21 juta jiwa setiap tahun dengan angka kematian mencapai 128.000 - 161.000 dan sebagian besar terjadi di Asia Selatan dan Asia Tenggara (WHO, 2018).

Selain demam tifoid, penyakit yang paling mungkin terjadi untuk masyarakat yang tinggal di daerah dengan lingkungan yang kurang bersih ialah infeksi pada lapisan kulit. Umumnya, infeksi pada kulit disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*. Bakteri ini sejatinya merupakan flora normal yang hidup berdampingan dengan manusia, namun keadaan lingkungan yang kurang mendukung turut mendorong kasus infeksi tak biasa dengan waktu penyembuhan yang tidak sebentar.

Saat ini telah banyak obat-obatan yang diproduksi berupa antibiotik. Untuk mengatasi kedua penyakit tersebut, biasanya digunakan obat (antibiotik) golongan sefalosporin, kloramfenikol, aminoglikosida, quinolon, penisilin, beta-laktam, dan tetrasiklin (Suheri, 2015 ; Tandi, 2017). Permasalahan baru timbul dengan berkembangnya strain yang resisten terhadap antibiotik. Resistensi bakteri terhadap antibiotik yang telah ada terjadi akibat penggunaan antibiotik yang tidak tepat, misalnya penggunaan dengan dosis yang tidak memadai, serta pemakaian yang tidak teratur. Dari sekian banyak golongan obat yang digunakan untuk mengatasi infeksi bakteri patogenik, hampir seluruhnya telah mengalami resistensi. Kasus resistensi terbesar ialah *S. aureus* terhadap penisilin dengan persentase sebesar 86% (Lencastre, 2007). Bahkan, penggunaan obat ini sudah mulai dihentikan di beberapa puskesmas di Kota Padang (Suheri, 2015).

Untuk mengatasi penyakit infeksi yang muncul akibat dari bakteri yang sudah resisten terhadap antibiotik, maka perlu dilakukan pencarian senyawa antibiotik baru yang lebih efektif dan efisien dalam mengatasi permasalahan bakteri *multidrug resistant* (MDR). Berbagai pendekatan telah dilakukan untuk mendapatkan senyawa antibiotik yang baru, salah satunya adalah dengan mencari senyawa bioaktif dari mikroorganisme yang bersimbiosis dengan mangrove (Pringgenies, 2015).

Tumbuhan bakau (mangrove) secara turun temurun dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai bahan obat berkhasiat seperti diare, mual, luka bakar, hingga luka bernanah (Kusmana *et al.*, 2009). Salah satunya jenis mangrove yang banyak dimanfaatkan sebagai bahan obat berkhasiat ialah *Avicennia* sp. Menurut Kusmana (2009), mangrove jenis *Avicennia* sp. yang terdapat di Indonesia mengandung senyawa alkaloid, saponin, tanin, fenolik, flavonoid, triterpenoid dan glikosida

serta tidak ditemukan adanya steroid. Beberapa ilmuwan mengatakan bioaktivitas yang terdapat dalam bagian-bagian tumbuhan bakau tidak selalu berasal dari tumbuhan bakau tersebut, namun dapat berasal dari organisme lain yang hidup di bagian dari tumbuhan bakau (endosimbion) dan organisme ini dapat mensintesis senyawa bioaktif yang dapat bersifat sebagai antibakteri (Prihanto, 2012).

Keanekaragaman hayati di dalam suatu biosfer menggambarkan keragaman kandungan bahan kimia di dalamnya. Endosimbion yang hidup dalam tumbuhan memiliki fungsi untuk mempertahankan eksistensi dari tumbuhan inang untuk dapat bertahan hidup dan mempertahankan diri dari organisme patogen (Posangi dan Bara, 2015).

Keadaan yang demikian membuat organisme endosimbion berevolusi secara konstan untuk menghasilkan senyawa-senyawa kimia baru guna melindungi inang mereka. Daerah tropis adalah contoh luar biasa dari jenis lingkungan yang cocok untuk berbagai jenis endosimbion. Dalam ekosistem yang terdapat di daerah ini, perlawanan endofit melawan organisme patogen dan predator cukup besar, sumber daya yang terbatas, serta tekanan seleksi alam sangat tinggi (Strobel, 2004). Hal ini menimbulkan kemungkinan besar bahwa endosimbion di daerah tropis seperti Indonesia, khususnya Provinsi Lampung, memiliki sumber struktur senyawa baru dengan aktivitas biologis yang menarik. Seiring dengan pesatnya perkembangan zaman, berbagai penelitian dilakukan guna meredakan masalah kesehatan di tengah masyarakat yang disebabkan oleh bakteri patogen, seperti bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*.

Penelitian ini dilakukan guna menemukan mikroba endosimbion yang berpotensi dijadikan sebagai antibakteri. Penelitian ini, dapat menjadi langkah awal ditemukannya kelas antibiotik baru yang mampu mengatasi permasalahan bakteri MDR.

## 1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian dengan judul “Potensi Bakteri Endosimbion Mangrove *Avicennia* sp. di Perairan Lampung sebagai antibakteri terhadap Bakteri *S. typhi* (Smith, 1885) dan *S. aureus* (Ogston, 1880)” yaitu :

1. Skrining bakteri endosimbion mangrove yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. typhi* dan *S. aureus*.
2. Memperoleh besaran kemampuan daya hambat isolat bakteri potensial terhadap bakteri *S. typhi* dan *S. aureus*.
3. Identifikasi bakteri endosimbion mangrove yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. typhi* dan *S. aureus*.

### **1.3 Manfaat Penelitian**

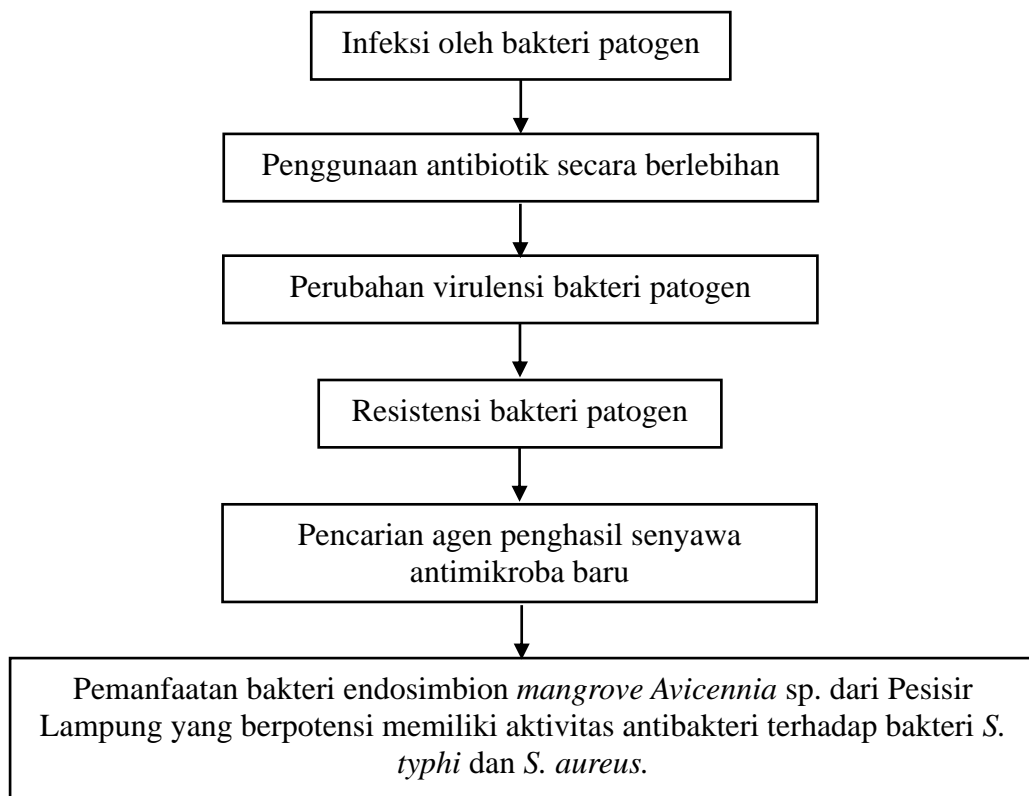
Manfaat penelitian yaitu diperoleh isolat bakteri endosimbion potensial serta informasi mengenai potensi antibakteri pada bakteri endosimbion mangrove *Avicennia* sp. Perairan Lampung dan kemampuan daya hambatnya terhadap bakteri *S. typhi* dan *S. aureus*.

### **1.4 Kerangka Pikir**

Penyakit infeksi oleh bakteri terutama di negara tropis seperti Indonesia masih merupakan permasalahan yang menuntut perhatian besar. Salah satunya ialah infeksi pada manusia yang disebabkan oleh bakteri *S. typhi* dan *S. aureus*. Insidensi infeksi oleh bakteri apapun meningkat seiring dengan perubahan imunitas penderita dan akibat perubahan virulensi bakteri patogen terhadap antibiotik. Hal ini menyebabkan bakteri menjadi resisten dan tahan terhadap obat antibiotik yang beredar di masyarakat. Dari sekian banyak golongan obat yang digunakan untuk mengatasi infeksi bakteri patogenik, hampir seluruhnya telah mengalami resistensi. Kasus resistensi terbesar ialah *S. aureus* terhadap penisilin dengan persentase sebesar 86% (Lencastre, 2007). Bahkan penggunaan obat ini sudah mulai dihentikan di beberapa puskesmas di Kota Padang (Suheri, 2015).

Resistensi yang terjadi pada bakteri patogen mendorong dilakukannya pencarian agen penghasil senyawa antimikroba yang berpotensi dijadikan sebagai bahan obat baru. Mempertimbangkan penggunaan mangrove sebagai tanaman obat tradisional, maka pemanfaatan mikroba endosimbion mangrove *Avicennia* sp. dapat dilakukan guna menemukan senyawa baru yang berpotensi sebagai antibakteri terhadap bakteri *S. typhi* dan *S. aureus*.

Mikroba endosimbion dapat berupa bakteri, jamur atau mikroba lainnya. Mikroba endosimbion mangrove diketahui mampu menghasilkan senyawa metabolit yang sama dengan tumbuhan inangnya. Dalam satu tumbuhan dapat diisolasi lebih dari satu bahkan puluhan jenis mikroba endofit yang masing-masing mempunyai potensi untuk memproduksi satu atau lebih senyawa bioaktif yang sama dengan inangnya (Ling, 2007).



Gambar 1. Kerangka pikir penelitian

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Mangrove *Avicennia* sp

Komunitas tumbuhan mangrove merupakan tumbuhan penghasil biji (spermatophyta) dan bunganya sering kali menyolok. Biji mangrove relatif lebih besar dibandingkan dengan biji kebanyakan tumbuhan lain dan seringkali mengalami perkecambahan ketika masih melekat di pohon induk (vivipar). Pada saat jatuh biji mangrove biasanya akan mengapung dalam jangka waktu tertentu kemudian tenggelam. Lamanya periode mengapung bervariasi bergantung pada jenisnya. Biji beberapa jenis mangrove dapat mengapung lebih dari setahun dan tetap viabel.

Mangrove *Avicennia* sp. merupakan tumbuhan yang dapat tumbuh dengan lingkungan yang berlumpur dan perairan dangkal di daerah pesisir dimana air yang ada umumnya payau. Daerah tersebut merupakan tempat yang sulit bagi banyak tumbuhan untuk hidup, namun *Avicennia* sp. mampu bertahan dalam kondisi tersebut karena merupakan tumbuhan yang sangat mudah beradaptasi dengan lingkungan tempatnya tumbuh. Oleh karena itu, mangrove mengandung banyak senyawa bioaktif yang bersifat toksikologis, farmakologis, dan ekologis (Kokpol *et al.*, 1990). Sebagian besar jenis-jenis mangrove ini tumbuh dengan baik pada tanah berlumpur, terutama di daerah endapan lumpur terakumulasi. Di Indonesia, substrat berlumpur ini sangat baik untuk tegakan *Rhizophora mucronata* dan *Avicennia marina*. *Avicennia* merupakan marga yang memiliki kemampuan toleransi terhadap kisaran salinitas yang luas dibandingkan dengan marga lainnya (Kokpol *et al.*, 1990).

Di Indonesia, ekstrak dan bahan mentah dari tumbuhan mangrove telah digunakan oleh masyarakat pesisir. Sebagian besar dari tumbuhan mangrove digunakan sebagai bahan obat. Ekstrak dan bahan mentah dari tumbuhan mangrove

telah digunakan oleh masyarakat pesisir untuk keperluan pengobatan alamiah. Kandungan saponin triterpenoid dari *Acanthus illicifolius* menunjukkan aktivitas leukimia, paralysis, asma, rematik serta anti peradangan; dan alkaloid dari *Antrileks vesicaria* juga berkhasiat sebagai senyawa bakterisida (Purnobasuki, 2004).

## 2.2 Potensi Senyawa Antibakteri pada Mangrove

Pemanfaatan berbagai jenis tumbuhan mangrove (terutama jenis pohon dari marga *Rhizophora*, *Bruguiera*, *Avicennia* dan *Sonneratia*) secara tradisional oleh masyarakat pesisir di Indonesia telah lama berlangsung sejak beberapa abad yang lalu. Pemanfaatan secara tradisional dari berbagai jenis tumbuhan mangrove tersebut merupakan pemanfaatan tingkat awal dari sumber daya mangrove berdasarkan pengetahuan lokal masyarakat yang sampai saat ini tidak terdokumentasikan secara baik.

Salah satu yang menjadi sumber antibiotik alami adalah tumbuhan *mangrove* yang merupakan kekayaan alam potensial. Tumbuhan mangrove mengandung senyawa seperti alkaloid, flavonoid, fenol, terpenoid, steroid dan saponin. Golongan senyawa ini merupakan bahan obat-obatan modern (Danata, 2014).

Khusus untuk jenis api-api (*Avicennia* sp.) masyarakat pesisir di Indonesia sudah sejak lama memanfaatkannya secara tradisional untuk memenuhi kebutuhan pangan seperti obat-obatan, kayu bakar, konstruksi bangunan rumah, dan pakan ternak (Kusmana *et al.*, 2009). Menurut Kusmana (2009), mangrove jenis *Avicennia* yang terdapat di Indonesia mengandung senyawa alkaloid, saponin, tanin, fenolik, flavonoid, triterpenoid dan glikosida, serta tidak ditemukan adanya steroid. Namun, Abeysinghe *et al.* (2006) menemukan kandungan senyawa steroid pada *A. marina* yang terdapat di Sri Lanka. Oktavianus (2013) mengemukakan bahwa terdapat perbedaan kemampuan antibakteri secara signifikan sebagai akibat dari perbedaan habitat mangrove *A. marina* yang dikoleksi di Sulawesi Selatan.

## 2.3 Bakteri Endosimbion Mangrove

Bakteri endosimbion adalah bakteri yang hidup di dalam jaringan tanaman inang tanpa menyebabkan gejala-gejala penyakit (Bhore dan Sathisha, 2010). Beberapa jenis bakteri endosimbion diketahui mampu menghasilkan senyawa aktif



yang bersifat antibiotik, antimalaria, dan antifungi (Simanjuntak *et al.*, 2004 ; Trianto *et al.*, 2019). Kemampuan bakteri endosimbion menghasilkan senyawa aktif tersebut merupakan potensi yang dapat dikembangkan mengingat umumnya senyawa aktif diperoleh dengan mengekstraksi tanaman, khususnya tanaman obat. Potensi bakteri endosimbion mangrove secara lengkap disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas biologis senyawa metabolit bakteri endosimbion

Senyawa metabolit	Aktivitas biologis
Hexahydro-pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione	Antimikroba, antioksidan
3-Isobutylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione	Antimikroba, nematisidal, dan anti-mutagenik
Palmitic acid	Antibakteri
Diisooctyl phthalate	Antibakteri, antifungi
Linoleic acid	Antibakteri
9(E)-Octadecenoic acid	Antibakteri
Stearic acid	Antibakteri
Benzyl alcohol	Antibakteri
2,3,5,6-Tetramethylpyrazine	Antioksidan, antikanker, anti-inflamasi
Phenylethyl alcohol	Antibakteri
Benzoic acid	Antimikroba
Methyl phenylacetate	Antimikroba
Benzeneacetic acid	Antimikroba
Benzenepropanoic acid	Antimikroba
2,4-Di-tert-butylphenol	Antifungi, antioksidan
Hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione	Antibakteri, antioksidan
Myristic acid	Antibakteri
12-Methyltetradecanoic acid	Antifungi, antikanker
Methyl palmitate	Antibakteri, antiinflamasi
3-Isobutylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione	Antimikroba, nematisidal, dan anti-mutagenik
Palmitic acid	Antibakteri
Cyclo(phe-pro)	Antimikroba, antikanker
3-Benzylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione	Antibiofilm, antikuorum sensing
Diocetyl phthalate	Antibakteri, antitirosinase
Palmitic acid	Antimikroba, antioksidan
(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic acid	Antiinflamasi, nematisidal, dan hepatoprotektif
cis-Vaccenic acid	Antibakteri, hipolipidemik
Stearic acid	Antibakteri, antifungi
1,2-Benzenedicarboxylic acid	Antifungi, antikanker

\*Sumber : Dat (2021)

Mikroba endosimbion memproduksi senyawa metabot sekunder sesuai dengan tanaman inangnya. Hal ini merupakan peluang besar bagi mikroba tersebut untuk memproduksi metabolit. Berbagai jenis mikroba endosimbion berhasil diisolasi dari tanaman inangnya dan dibiakkan dalam media kultivasi yang sesuai. Demikian pula metabolit sekunder yang diproduksi oleh mikroba tersebut telah berhasil diisolasi dan dimurnikan serta dielusidasi struktur molekulnya (Radji, 2005).

Bakteri endosimbion yang telah masuk ke dalam tanaman dapat tumbuh hanya di satu titik tertentu atau menyebar ke seluruh tanaman. Mikroorganisme ini dapat hidup di dalam pembuluh vaskular atau di ruang intersel, akar, batang, daun, dan buah (Zinniel *et al.*, 2002 ; Simarmata *et al.*, 2007).

## 2.4 Bakteri Patogen

Bakteri patogen merupakan mikroorganisme yang hidup berdampingan dengan manusia, namun cenderung memberikan efek buruk berupa penyakit. Permasalahan terbesar dari bakteri ini ialah perubahan virulensi yang membuatnya resisten terhadap beberapa antibiotik. Berikut adalah bakteri patogen yang telah mengalami kasus resistensi dan ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Daftar bakteri patogen yang telah mengalami resistensi

Bakteri Patogen	Jenis Antibiotik
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenem
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenem
<i>Enterobacteriaceae</i> , extended-spectrum $\beta$ -lactamase-producing	Carbapenem
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomycin
* <i>Staphylococcus aureus</i>	Methicillin, vancomycin
<i>Helicobacter pylori</i>	Clarithromycin
<i>Campylobacter spp.</i>	Fluoroquinolone
* <i>Salmonellae</i>	Fluoroquinolone
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cephalosporin, fluoroquinolone
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicillin-non-susceptible
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicillin
<i>Shigella spp.</i>	Fluoroquinolone

\* Keterangan : Bakteri patogen yang paling sering menginfeksi manusia  
 Sumber : Sangappa (2015), Willyard (2017).

Dari sekian banyak bakteri patogen yang telah mengalami resistensi terhadap berbagai jenis antibiotik, terdapat bakteri yang paling sering menginfeksi manusia, yakni kelompok *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus*.

#### 2.4.1 *Salmonella typhi*

Klasifikasi *Salmonella typhi* menurut (Riedel *et al.*, 2019) yaitu sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Ordo	: Gamma proteobacteria
Kelas	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Salmonella</i>
Spesies	: <i>Salmonella typhi</i>

*Salmonella typhi* merupakan bakteri berbentuk batang Gram negatif, tidak berspora, memiliki flagel peritrik, berkembang biak dengan cara membelah diri, dan berukuran 1-3,5  $\mu\text{m}$  x 0,5-0,8  $\mu\text{m}$ . *S. typhi* tumbuh pada suasana aerob, pada suhu 15-41°C dengan optimal 37°C dengan pH media 6-8. *S. typhi* akan mati pada suhu 56°C dalam keadaan kering, dapat bertahan hidup di air selama 4 minggu, hidup subur pada medium yang mengandung garam empedu, dan tahan terhadap zat warna hijau brilliant, senyawa natrium tetrasetat dan natrium deoksikolat (Riedel *et al.*, 2019).

Struktur antigen pada bakteri ini ada tiga, yaitu antigen Vi (kapsul), H (flagel), dan O (somatik). Antigen O tahan terhadap pemanasan hingga suhu 100°C, asam, dan alkohol. Antigen H akan rusak pada pemanasan dengan suhu lebih dari 60°C, asam, dan alkohol. Antigen Vi merupakan polimer polisakarida dengan sifat asam yang rusak pada pemanasan 60°C dengan penambahan asam dan fenol selama 1 jam, serta terdapat pada bagian luar bakteri (Riedel *et al.*, 2019).

### 2.4.2 *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi *S. aureus* menurut Bergey (1985) dalam Cappucino (1993)

adalah:

Kingdom	: Monera
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Staphylococcaceae
Genus	: <i>Stahylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i> .

Bakteri *S. aureus* adalah bakteri jenis *coccus* (bulat) yang hidup berge-rombol. Tak seindah namanya Staphyle, dari bahasa Yunani yang berarti anggur. Bakteri ini merupakan mikroba berbahaya yang bisa menyebabkan infeksi pada kulit, atau meracuni makanan sehingga menimbulkan penyakit serius pada manusia. *S. aureus* biasanya hidup pada jaringan kulit dan lubang hidung manusia. Dalam kondisi sehat dan normal, bakteri ini tidak menginfeksi karena tubuh kita memiliki mekanisme perlindungan seperti kastil yang dijaga prajurit-prajurit bernama antibodi. Infeksi biasanya dipicu oleh luka luar atau penetrasi bakteri melalui makanan yang tercemar. Dalam jumlah terbatas bakteri ini juga terdapat pada pori-pori dan permukaan kulit, kelenjar keringat, dan saluran usus (Entjang, 2003).

*S. aureus* dapat mengganggu sistem imun pada tubuh manusia karena mengikat antibodi, menyerang membran sel, dan menyebabkan hemolisis serta leukolisis yang mematikan sel tubuh manusia. Bakteri yang masuk ke dalam aliran darah juga bisa bersarang di dalam paru-paru menyebabkan organ tersebut ber-nanah dan infeksi klep jantung (endocarditis) yang bisa mengakibatkan gagal jan-tung. Infeksi pada sel tulang berakibat peradangan berat osteomyelitis (Syam-sunir, 1992).

### 2.5 Ekstraksi Bakteri

Ekstraksi bakteri dilakukan untuk mendapatkan zat yang terkandung di-dalam bakteri, baik dilakukan secara langsung maupun tak langsung. Ekstraksi

bakteri secara langsung dilakukan terhadap bakteri tanpa media tumbuhnya. Sedangkan ekstraksi secara tak langsung yaitu ekstraksi dengan menggunakan media tumbuhnya.

Yati (2018) melakukan ekstraksi bakteri secara langsung. Bakteri ditumbuhkan dalam media NB sebanyak 10 ml lalu dikocok menggunakan *shaker* dengan kecepatan 170 rpm selama 72 jam pada suhu 37° C. Hasil fermentasi disentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan supernatan dan biomassa. Supernatan yang diperoleh kemudian diekstraksi dengan etil asetat dengan perbandingan (1/2: v/v) dengan menggunakan corong pisah dan didiamkan selama 20 menit. Lapisan atas (fase etil asetat) dituang ke dalam erlenmeyer, sedangkan residu cairan media (lapisan bawah) diikutkan ke ekstraksi berikutnya. Fase etil asetat selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan *rotary evapor* pada suhu 35°C sehingga diperoleh ekstrak kental.

Hendriyanto (2012) melakukan ekstraksi bakteri secara tak langsung yang berasosiasi dengan spons. Mula-mula bakteri ditumbuhkan pada media NA dengan air laut dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Media NA yang telah ditumbuhi bakteri dipotong-potong kecil dan siap untuk dimaserasi. Maserasi dilakukan dengan merendam potongan-potongan kecil media NA ke dalam pelarut metanol 70 % sampai terendam seluruhnya selama 3 hari, kemudian disaring dengan kertas penyaring. Ekstrak hasil maserasi yang dihasilkan ditampung dan diuapkan untuk memisahkan pelarutnya. Penguapan dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45-50 °C sampai pelarut habis menguap sehingga didapatkan ekstrak kental bakteri.

## 2.6 Identifikasi Molekuler

Identifikasi molekuler merupakan sebuah analisis yang dilakukan untuk mendapatkan informasi terkait genetik makhluk hidup. Dalam perkembangannya, identifikasi molekuler digunakan untuk berbagai macam kepentingan, mulai dari medis hingga penelitian. Dalam bidang penelitian, identifikasi jenis ini digunakan untuk mendapatkan informasi jenis suatu makhluk hidup. Metode ini biasa dilakukan dalam mengidentifikasi mikroorganisme. Dalam pelaksanaannya, metode ini

dilakukan melalui berbagai tahapan. Mulai dari ekstraksi DNA, amplifikasi PCR, pembuatan gel agarosa, elektroforesis, dan sekuensing.

Penelitian berbasis genetika molekuler semakin berkembang setiap tahunnya. Sejak penemuan DNA (*deoxyribonucleic acid*) heliks ganda dari Watson-Crik, para peneliti semakin tergugah untuk membuka cakrawala baru di bidang genetika molekuler, di antara dengan penemuan-penemuan enzim restriksi, teknik manipulasi gen dan rekayasa genetika, perkembangan kultur sel terutama kultur *stem cell*, pembuatan hewan transgenik, dan *knockout* untuk lebih memperdalam fungsi dari suatu sel (Fatchiyah, 2011).

DNA merupakan molekul penyusun kromosom yang tersusun atas basa-basa nukleotida, gula pentose/ deoksiribosa dan gugus fosfat. Empat macam basa nitrogen yaitu adenin, guanin, timin dan sitosin. Basa adenin dan guanin digolongkan sebagai basa purin, sedangkan basa timin dan sitosin sebagai basa pirimidin. Gula pentosa dan gugus fosfat bersifat identik. Urutan nukleotida DNA terdiri dari daerah yang mengkode gen yang disebut ekson, daerah bukan pengkode DNA disebut intro, regulator gen, dan daerah urutan berulang seperti mikrosatelit, *telomere*, *variable number tandem repeat* (VNTR), *sequence tagged site* (STS) dan *single nucleotide polymorphism* (SNP) (Campbell *et al*, 2002 ; Fatchiyah, 2011).

## **2.7 Teknik Identifikasi Molekuler**

### **2.7.1. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)**

PCR merupakan suatu teknik yang didalamnya melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus). Di setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda atau perbanyak DNA. Pada untai (*unamplified*) DNA akan dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan sampai pada suhu tertentu dalam kurung waktu untuk bisa melakukan penempelan primer (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (*extend primers*) dengan adanya dNTPs (*deoxynucleotide triphosphates*) yang merupakan campuran yang terdiri atas dATP (*deoksiadenosin trifosfat*), dCTP (*deoksisitidin trifosfat*), dGTP (*deoksiguanosin trifosfat*) dan dTTP (*deoksitimidin trifosfat*) dan *buffer* yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan

antara 20-40 siklus. Target DNA yang diinginkan (*short "target" product*) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA *nontarget* (*long product*) akan meningkat secara linier (Newton and Graham, 1994). PCR melibatkan tiga tahap siklus temperatur yang berurutan, yaitu denaturasi DNA, *annealing* (pelekatan) pasangan primer pada untai ganda DNA target dan *extention* (pemanjangan) (Sogandi, 2018).

### **2.7.1.1 Denaturasi**

Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Umumnya terjadi pada suhu  $\geq 95^{\circ}\text{C}$ . Ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit untuk meyakinkan bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (membentuk DNA untai ganda lagi) secara cepat, dan ini mengakibatkan gagalnya proses PCR. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktivitas enzim *taq polymerase*. Aktifitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada suhu 92,5, 95 dan 97,5 $^{\circ}\text{C}$ .

### **2.7.1.2 Annealing (Pelekatan)**

*Annealing* yaitu pelekatan primer yang terjadi pada suhu  $\geq 35\text{-}65^{\circ}\text{C}$  bergantung pada panjang pendeknya oligonukleotida primer yang digunakan. Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18 – 25 basa, mengandung 50 – 60 % G+C. Sekuens DNA dalam masing-masing primer tersebut juga sebaiknya tidak saling berkomplemen karena dapat mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan mengurangi efisiensi PCR. Waktu *annealing* yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30 – 45 detik. Semakin panjang ukuran primer, semakin tinggi temperaturnya.

### **2.7.1.3 Extention (Pemanjangan)**

Tahap ekstensi (pemanjangan) primer terjadi sebagai hasil aktivitas polimerisasi oleh enzim *taq polimerase* yang pada umumnya dilakukan pada suhu 70 $^{\circ}\text{C}$ .

Selama tahap ini *taq polymerase* memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada diperkirakan 35 – 100 nukleotida/detik, bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam, dan molekul DNA target. Dengan demikian, untuk produk PCR dengan panjang 2.000 pasang basa, waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap perpanjangan primer ini. Biasanya di akhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan terbentuk DNA untai ganda.

### **2.7.2 Elektroforesis**

Elektroforesis gel agarose digunakan untuk mengetahui keberadaan dan membedakan jenis asam nukleat yang didapat dari hasil ekstraksi serta digunakan untuk menganalisis produk hasil pemotongan dengan enzim restriksi. Prinsip elektroforesis adalah berdasarkan laju perpindahan suatu molekul oleh gaya gerak listrik di dalam matriks gel. Laju perpindahan bergantung pada ukuran molekulnya, semakin kecil ukurannya maka molekul akan semakin cepat lajunya, begitu pula sebaliknya. Sampel molekul ditempatkan ke dalam sumur pada gel yang berada di dalam larutan penyangga dan dialirkan listrik pada tegangan tertentu. Molekul-molekul sampel akan bergerak di dalam matriks gel ke arah salah satu kutub listrik sesuai muatannya. Arah pergerakan untuk RNA dan DNA adalah menuju elektroda positif karena adanya muatan negatif pada rangka gula-fosfat yang dimiliki (Berg *et al.*, 2007).

### **2.7.3 Sekuensing**

Sekuensing DNA atau pengurutan DNA adalah proses atau teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA. Urutan tersebut dikenal sebagai sekuen DNA yang merupakan informasi paling mendasar suatu gen atau genom karena mengandung instruksi yang dibutuhkan untuk pembentukan tubuh makhluk hidup. Sekuensing DNA dapat dimanfaatkan untuk menentukan identitas maupun fungsi gen atau fragmen DNA lainnya dengan cara membandingkan sekuensnya dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui. Teknik ini digunakan



dalam riset dasar biologi maupun berbagai bidang terapan seperti kedokteran, bioteknologi, forensik, dan antropologi (Balsover, 1997).

Sekuens DNA menyandikan informasi yang diperlukan bagi makhluk hidup untuk melangsungkan hidup dan berkembang biak. Dengan demikian, penentuan sekuens DNA berguna di dalam ilmu pengetahuan murni mengenai mengapa dan bagaimana makhluk hidup dapat hidup, selain berguna dalam penerapan praktis. Oleh karena DNA merupakan ciri kunci makhluk hidup, pengetahuan akan sekuens DNA dapat berguna dalam penelitian biologi manapun. Contohnya dalam ilmu pengobatan, sekuensing DNA dapat digunakan untuk mengidentifikasi, mendiagnosis, dan mengembangkan pengobatan penyakit genetik (Yuwono, 2005).

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada 5 Februari – 23 Juni 2021 yang bertempat di Laboratorium Budidaya Perikanan, Jurusan Perikanan dan Ilmu Kelautan, Fakultas Pertanian dan Laboratorium Bioteknologi Pertanian, Universitas Lampung. Pada penelitian ini, sampling dilakukan di perairan Way Belau Kecamatan Teluk Betung Timur, Kota Bandar Lampung dan di perairan Pagar Jaya, Kecamatan Punduh Pidada, Kabupaten Pesawaran.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Tabel 3. Alat yang digunakan

No	Alat	Keterangan / fungsi
1	<i>Autoclave</i>	Sterilisasi alat dan bahan.
2	Bunsen	Sterilisasi didalam <i>laminar airflow</i> .
3	Cawan petri	Wadah media tumbuh mikroba.
4	<i>Coolbox</i>	Alat penyimpanan sampling.
5	Pinset	Untuk mengambil <i>papper disk</i> .
6	<i>Erlenmeyer</i>	Alat untuk membuat media.
7	Gelas ukur	Untuk mengukur pelarut saat membuat media.
8	<i>Hot plate</i>	Untuk menghomogenkan media.
9	Inkubator	Menginkubasi mikroba dengan suhu terkontrol.
10	Jangka sorong	Untuk mengukur zona bening.
11	Jarum ose	Untuk menginokulasi mikroba.
12	Jas laboratorium	Alat pelindung dan menjaga tubuh tetap steril.
13	Kamera ponsel	Dokumentasi.
14	<i>Laminar airflow</i>	Menghindari kontaminasi.
15	Laptop	Mencatat dan mengolah data hasil uji.
16	Lemari Pendingin	Menyimpan media kosong.
17	<i>Log book</i>	Untuk mencatat data mikroba.
18	Pipet tetes	Untuk mengambil larutan

Tabel 3. Alat yang digunakan (lanjutan)

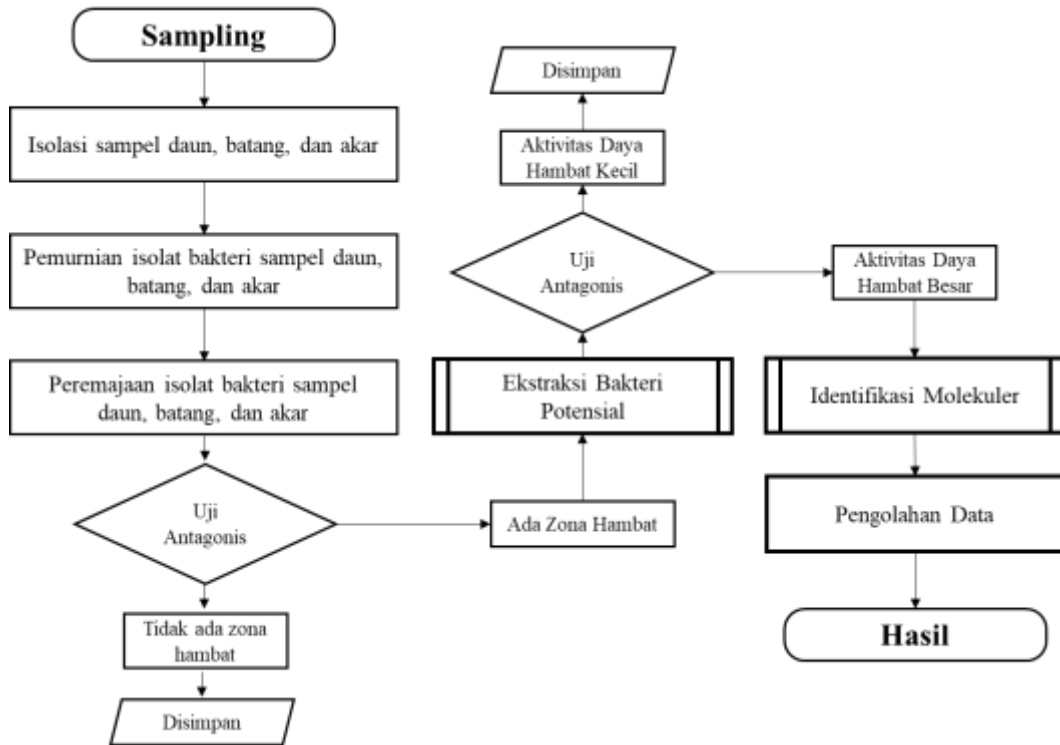
No	Alat	Keterangan / fungsi
19	Pisau/ <i>Cutter</i>	Untuk memotong, menyayat sampel.
20	<i>Shacker</i>	Untuk mencegah penggumpalan bakteri patogen .
21	Spidol	Mencatat data.
22	Tabung reaksi	Wadah media tumbuh isolat dan bakteri patogen.
23	Timbangan digital	Untuk menimbang media.

Tabel 4. Bahan yang digunakan

No	Bahan	Keterangan / fungsi
1	Akuades	Sebagai pelarut media, untuk sterilisasi pada <i>autoclave</i> .
2	Air laut steril	Sebagai pelarut media, untuk sterilisasi pada <i>autoclave</i> .
3	Alkohol	Disinfektan, sterilisasi alat dan diri.
4	<i>Aluminium foil</i>	Untuk membungkus alat.
5	<i>Chloramphenicol</i>	Sebagai kontrol +, menghindari kontaminasi media.
6	Kain kasa	Untuk membuat penutup tabung reaksi, dan <i>erlenmeyer</i> .
7	Karet gelang	Untuk merekatkan penutup dan mencegah udara masuk.
8	Masker	Mencegah terjadinya kontaminasi.
9	Sarung tangan medis	Melindungi tangan dan mencegah kontaminasi.
10	<i>Nystatin</i> 100.000 IU	Sebagai kontrol -, mencegah kontaminasi oleh jamur.
11	<i>Papper disk</i>	Untuk uji antagonis terhadap bakteri patogen.
12	Plastik tahan panas	Membungkus alat dan bahan saat sterilisasi.
13	Plastik wrap	Membungkus cawan petri.
14	<i>Tissue</i>	Membersihkan alat.
15	Zobell	Media tumbuh bakteri potensial dan patogen.

### 3.3 Prosedur Penelitian

Adapun prosedur penelitian ditampilkan dalam bentuk diagram alir dan dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Diagram alir metode penelitian

#### 3.3.1 Sampling Mangrove

Sampling merupakan kegiatan yang dilakukan untuk mengambil satu atau beberapa sampel penelitian. Sampel mangrove yang digunakan diambil dari perairan Way Belau, Kota Karang, Kecamatan Teluk Betung, Bandar Lampung dan di perairan Pagar Jaya, Kecamatan Punduh Pidada, Kabupaten Pesawaran. Jenis mangrove yang diambil adalah mangrove *Avicennia* sp. Sampel mangrove diambil pada 3 titik, yaitu laut, muara, dan pemukiman. Bagian mangrove yang diambil adalah bagian daun (tua dan muda), ranting, dan akarnya (di atas substrat dan di bawah substrat). Sampel mangrove *Avicennia* sp. diambil kemudian dibersihkan menggunakan air laut steril. Setelah itu sampel dimasukkan ke dalam plastik zip dan disimpan di dalam *coolbox*, kemudian dibawa ke laboratorium untuk dilakukan isolasi. Peta lokasi sampling dapat dilihat pada Lampiran 9 (Gambar 34 dan Gambar 35).

### 3.3.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian harus dalam keadaan steril. Proses sterilisasi alat dan bahan dilakukan dengan 2 (dua) cara, yaitu sterilisasi basah dan sterilisasi kering. Sterilisasi basah dilakukan ketika preparasi menggunakan *autoclave*. Sterilisasi kering dilakukan ketika sedang melakukan isolasi, inokulasi, pemurnian, hingga peremajaan. Alat yang digunakan dengan sterilisasi kering berupa cawan petri, *spreader*, dan jarum ose.

### 3.3.3 Pembuatan Media

Media merupakan sebuah tempat tumbuh bakteri. Media yang dibutuhkan yaitu berupa media *Zobell* dalam bentuk padat dan cair. *Zobell* cair merupakan modifikasi dari *Zobell* tanpa menggunakan agar dan ditambahkan air. Pada setiap media, penambahan air disesuaikan dengan asal isolat. Isolat yang berasal dari laut, menggunakan air laut steril. Isolat yang berasal dari air tawar, menggunakan akuades. Untuk menghindari kontaminasi, media diberi antijamur (*nystatin*) dengan dosis 0,01 ml/ml. Adapun komposisi media yang digunakan berdasarkan Stamets (2007), yaitu sebagai berikut :

Tabel 5. Komposisi media *Zobell*

Komposisi	Satuan	1.000 ml
<i>Peptone</i>	g	2,5
<i>Yeast extract</i>	g	0,5
Agar	g	15
<i>Nystatin</i> (100.000 IU)	ml	100
Air	ml	1.000

### 3.3.4 Isolasi Bakteri Endosimbion Mangrove

Isolasi adalah sebuah proses untuk menumbuhkan bakteri yang berasal dari sampel pada media. Isolasi dilakukan dengan cara menyayat sampel (daun, batang, buah, dan akar) dan meletakkan sayatan tersebut pada media. Sampel daun, batang, dan akar mangrove *Avicennia* sp. dikeluarkan dari dalam *coolbox* untuk kemudian direndam menggunakan alkohol 70% selama 30 detik. Perendaman dilakukan sebanyak 2 kali untuk memastikan sampel dalam keadaan steril. Selanjutnya, daun, batang, buah, dan akar, disayat melintang menggunakan pisau,

lalu diletakkan ke dalam cawan yang telah berisi media *Zobell*. Bagian yang diletakkan ke dalam cawan adalah endodermis atau bagian dalam sayatan. Kemudian cawan dibungkus menggunakan plastik pembungkus. Setelah itu, cawan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.

### **3.3.5 Inokulasi dan Identifikasi Bakteri**

Setelah terjadi pertumbuhan, dilakukan inokulasi ke media cawan *zobell* untuk memisahkan isolat yang terletak berdekatan pada saat isolasi. Inokulasi merupakan proses pemindahan suatu mikroorganisme (bakteri) dari media lama ke media yang baru. Kegiatan inokulasi sering disebut juga sebagai peremajaan. Mula-mula sampel yang di sekitarnya ditumbuhi bakteri ditandai dan diberikan kode untuk mempermudah identifikasi.

Kode WB diberikan untuk mewakili isolat yang berasal dari sampel Way Belau dan PJ untuk mewakili isolat yang berasal dari sampel Pagar Jaya. Bakteri yang telah diberi kode sebagai isolat terpilih dipindahkan ke media *zobell* yang baru dan diinkubasi. Isolat yang telah tumbuh diidentifikasi berdasarkan karakteristik warna, bentuk, dan tekstur. Bakteri yang memiliki karakteristik yang berbeda dengan bakteri lainnya ditandai. Cara penandaan isolat yaitu dengan pemberian kode berupa huruf berdasarkan jenis bakteri, titik pengambilan sampel dan bagian mangrove.

### **3.3.6 Pemurnian Isolat Bakteri**

Bakteri yang telah tumbuh pada media inokulasi dipindahkan untuk dilakukan proses pemurnian di media tabung miring agar didapatkan satu koloni dan diberi nama/label sesuai bagian mangrove, urutan isolat, kemudian diinkubasi kembali di inkubator selama 24 jam. Bakteri murni yang telah tumbuh disimpan pada suhu rendah, yaitu kurang dari 10° C. Untuk penyimpanan bakteri dalam waktu cukup lama (maksimal 60 hari) dapat disimpan pada suhu di bawah -20° sampai -70° dengan penambahan DMSO (*di-methylsulfoxide*).

### 3.3.7 Uji Antagonis

Uji antagonis merupakan suatu uji yang dilakukan untuk melihat potensi isolat yang ditandai dengan adanya daya hambat atau zona bening (daerah yang tidak ditumbuhi patogen). Uji antagonis sering juga digunakan untuk memilah isolat potensial dari sekian banyak isolat yang didapat. Uji antagonis dilakukan dengan metode Kirby Bauer menggunakan kertas cakram. Isolot diuji tantang dengan *S. typhi* dan *S. aureus*. Isolot bakteri potensial diinokulasikan ke media *zobell* cair dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.

Bakteri patogen di-*spread* ke dalam cawan berisi media *Zobell* menggunakan *spreader*. Kertas cakram ditetesi dengan bakteri uji yang sudah tersedia dengan menggunakan mikropipet sebanyak 20  $\mu$ l, 2 kertas cakram lainnya diisi kontrol positif dan negatif. Kontrol positif menggunakan larutan kloramfenikol dengan kadar 1%, sedangkan kontrol negatif menggunakan media *Zobell* cair. Kemudian diinkubasi kembali selama 1-2 hari untuk dilihat ada atau tidaknya zona hambat.

Setelah uji dilakukan dan zona hambat terbentuk, kemudian diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong dan dicatat data hasil. Aktivitas isolat jamur terhadap bakteri uji dapat diklasifikasikan berdasarkan besar diameter zona hambat. Susanto *et al.* (2012) mengkategorikan zona hambat seperti pada Tabel 6.

Tabel 6. Kategori diameter zona hambat

Diameter	Kekuatan daya hambat
$\leq 5$ mm	Lemah
6 – 10 mm	Sedang
11 – 20 mm	Kuat
$\geq 21$ mm	Sangat kuat

### 3.3.8 Identifikasi Mikroskopis dan Uji Gram

Identifikasi mikroskopis dilakukan terhadap isolat bakteri yang memiliki aktivitas daya hambat. Identifikasi secara mikroskopis dilakukan guna mengetahui karakteristik bakteri berdasarkan bentuk tubuh. Identifikasi ini dilakukan dengan melakukan pengamatan menggunakan mikroskop. Isolot pada media miring diambil sebanyak 1 (satu) ose dan diletakkan di atas gelas objek yang telah ditetesi

akuades. Gelas objek yang telah disebar bakteri kemudian difiksasi di atas api. Selanjutnya bakteri diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali.

Uji Gram dilakukan dengan teknik pewarnaan Gram dan teknik KOH *string test*. Pewarnaan diawali dengan mengambil sebanyak 1 (satu) ose bakteri dan diletakkan di atas gelas objek yang telah ditetesi akuades. Gelas objek yang telah disebar bakteri kemudian difiksasi di atas api. Kemudian ditetaskan larutan Kristal violet pada gelas objek yang telah difiksasi sebelumnya dan dibiarkan selama 1 (satu) menit. Setelah itu, dibilas menggunakan akuades. Kemudian, ditetaskan larutan lugol di atas bakteri yang telah dibilas menggunakan akuades. Gelas objek ditetesi alkohol 96 %, dan digoyang-goyangkan selama 30 detik. Gelas objek kembali dibilas menggunakan akuades. Proses terakhir ialah ditetaskan gelas objek menggunakan larutan safranin dan didiamkan selama 1 menit. Setelah itu, dibilas kembali gelas objek untuk kemudian diamati menggunakan mikroskop.

Pengujian Gram dengan teknik KOH *string test* dilakukan dengan meneteskan KOH 3% sebanyak 1-2 tetes pada gelas objek. Inokulan bakteri pada media diambil dengan menggunakan ose dan digoreskan pada gelas objek, lalu diamati ada atau tidaknya lendir pada bakteri yang digoreskan pada gelas objek berisi KOH 3%. Adanya lendir menandakan bahwa bakteri tersebut Gram negatif dan tidak adanya lendir menandakan bahwa bakteri tersebut Gram positif.

### **3.3.9 Ekstraksi Bakteri Endosimbion Potensial**

Ekstraksi adalah sebuah proses yang dilakukan untuk mendapatkan bahan atau senyawa yang terkandung di dalam sel bakteri. Ekstraksi dapat dilakukan dengan perendaman atau maserasi menggunakan bahan pelarut. Bahan pelarut yang digunakan hendaknya bersifat nontoksik agar hasil yang didapatkan tidak bias. Penggunaan pelarut yang bersifat toksik akan menimbulkan kecurigaan terhadap hasil uji (bias), karena bisa saja daya hambat yang dihasilkan berasal dari bahan pelarut tersebut, sehingga pemilihan bahan pelarut menjadi hal yang cukup penting. Pada penelitian ini digunakan etil asetat sebagai bahan pelarut. Etil asetat merupakan zat semi polar yang memiliki sifan nontoksik dan mudah menguap. Sifatnya yang semi polar, diharapkan mampu menarik lebih banyak senyawa pada bakteri, sehingga ekstrak yang dihasilkan akan cenderung lebih banyak.



Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini yaitu berdasarkan Yati (2018) yang disesuaikan dan dimodifikasi. Bakteri endosimbion mangrove potensial ditumbuhkan dalam media NB sebanyak 250 ml lalu dikocok menggunakan *shacker* dengan kecepatan 170 rpm, selama 72 jam pada suhu 37°C. Hasil fermentasi disentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan supernatan dan biomassa (Yati, 2018).

Biomassa yang diperoleh kemudian diekstraksi dengan etil asetat menggunakan perbandingan (1/2: v/v) dan didiamkan selama 1x24 jam. Lapisan atas (fase etil asetat) dituang ke dalam erlenmeyer, sedangkan residu cairan media (lapisan bawah) diikutkan ke ekstraksi berikutnya. Fase etil asetat selanjutnya dipisahkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 35°C sehingga diperoleh ekstrak kental, untuk digunakan pada uji aktivitas ekstrak bakteri endosimbion mangrove terhadap bakteri patogen, yakni *S. typhi* dan *S. aureus* (Yati, 2018).

### **3.3.10 Uji Aktivitas Ekstrak Bakteri Endosimbion Potensial**

Uji aktivitas ekstrak dilakukan untuk melihat aktivitas ekstrak terhadap patogen. Oleh karena itu, uji ini sering disebut uji konfirmasi untuk melihat dari mana aktivitas daya hambat berasal. Aktivitas daya hambat dapat berasal dari sel dan juga senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya. Uji aktivitas dilakukan dengan metode Kirby Bauer atau difusi menggunakan kertas cakram. Ekstrak diuji tantang dengan *S. typhi* dan *S. aureus*. Bakteri patogen di-*spread* ke dalam cawan berisi media *Zobell* menggunakan *spreader*. Kertas cakram ditetesi dengan ekstrak yang sudah tersedia dengan konsentrasi 1% atau sekitar 10.000 ppm menggunakan mikropipet sebanyak 20 µl, 2 kertas cakram lainnya diisi kontrol positif dan negatif. Kontrol positif menggunakan larutan kloramfenikol dengan kadar 1%. Kemudian diinkubasi kembali selama 1-2 hari untuk dilihat ada atau tidaknya zona hambat.

### **3.3.11 Identifikasi Molekuler**

Identifikasi molekuler dilakukan untuk mengetahui spesies bakteri berdasarkan DNA. Identifikasi isolat bakteri endosimbion terpilih pada mangrove *Avicennia* sp. dari Pulau Pasaran dan Pagar Jaya, dilakukan secara molekuler dengan

tahapan-tahapan mulai dari ekstraksi DNA, amplifikasi PCR, pembuatan gel agarose, elektroforesis, dan analisis data sekuensing. Identifikasi bakteri didefinisikan dengan menggunakan sekuen 16S rRNA. Gen 16S rRNA dianalisis secara lengkap di Genetika Science Indonesia, Tangerang, Indonesia. Adapun langkah-langkah identifikasi molekuler secara lengkap yaitu sebagai berikut:

### 3.3.11.1. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA pada dasarnya merupakan serangkaian proses pemisahan DNA dari komponen-komponen sel lainnya. Ekstraksi DNA dilakukan melalui proses preparasi sampel (*sample preparation*), melisiskan sel (*cell lysis*), DNA *binding*, pencucian (*wash*) dan *elution*. Tahapan ini merupakan serangkaian proses pemisahan DNA dari komponen-komponen sel lainnya. Pada ekstraksi DNA ini, metode yang digunakan adalah metode ekstraksi DNA Kit (*Geneaid DNA Purification Kit*). Adapun langkah-langkah ekstraksi DNA adalah sebagai berikut:

#### 1) Preparasi Sampel Bakteri

Sampel bakteri dikultivasi dan diinkubasi selama 1x24 jam. Sampel bakteri dipanen dan dimasukkan 200 µl sample ke dalam tabung mikrocentrifuge 1,5 ml steril yang telah berisi 200µl PBS (*phospat buffer saline*) kemudian ditambahkan 20µl proteinase K. Sampel dihomogenkan dengan cara *pipetting*, kemudian diinkubasi pada 90°C selama 30 menit pada *water bath*.

#### 2) Melisiskan Sel Bakteri

Tahapan ini dimulai dengan memasukkan *carrier* RNA ke tabung *microcentrifuge* sebanyak 0.6 µl, ditambahkan 200 µl *buffer* S 2 ke dalam tabung *microcentrifuge* sebanyak 500 µl, lalu di-*vortex*. Ditambahkan proteinase K sebanyak 200 µl, lalu di-*vortex*, kemudian diinkubasi selama 10 menit. Ditambahkan 200 µl *GSB buffer* lalu di-*vortex*, kemudian diinkubasi selama 10 menit.

#### 3) DNA *Binding*

Proses DNA *binding* diawali dengan menambahkan ethanol 200 µl lalu di-*vortex* selama 10 detik. Dipindahkan semua campuran tersebut ke dalam GD column (*spin column*), disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 1 menit, dibuang *collection tube* yang berada di bawah *spin column* dan diganti dengan *collection tube* yang baru.

#### 4) *Wash* (Pencucian)

Setelah proses DNA *binding*, kemudian dilakukan proses pencucian DNA. Mula-mula sampel ditambahkan 400 µl buffer W1 lalu disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan yang sama, kemudian cairan yang ada pada *collection tube* dibuang. Ditambahkan 600µl *wash buffer* (*Geneid*), kemudian disentrifugasi selama 1 menit, lalu cairan pada *collection tube* dibuang dan disentrifugasi kembali selama 3 menit. Dibuang *collection tube* dan *microcentrifuge* steril diletakkan pada bagian bawah *spin column*.

#### 5) *Elution*

Selanjutnya ditambahkan 100 µl *elution buffer*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan yang sama selama 1 menit. Cairan yang mengandung DNA yang tertampung pada tabung *microcentrifuge* disimpan pada -40°C untuk digunakan sebagai template PCR.

### 3.3.11.2. Amplifikasi PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

Untuk melakukan tahap PCR (*polimerase chain reaction*) terdapat 3 tahapan, yaitu denaturasi dengan suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* dengan suhu 55°C selama 30 detik dan *extention* dengan suhu 72°C selama 1 menit. Prosedur ini dikerjakan pada sampel DNA yang telah diisolasi, ekstrak DNA dari sampel dan akuades sebagai kontrol negatif. PCR *mix* (enzim, MgCl<sub>2</sub>, fD1 (*forward*), rP2 (*reverse*), template DNA) dimasukkan ke dalam tabung PCR (Hiroaki, 2009).

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR (*DNA thermal cycler*). Untuk amplifikasi PCR, tahap awal denaturasi pada suhu 95°C selama 15 menit, selanjutnya 95°C selama 15 detik, *annealing* pada suhu 55°C selama 15 detik, ekstensi 72°C selama 1 menit sebanyak 30 siklus, dilanjutkan dengan ekstensi akhir suhu 72°C selama 5 menit, dan 12°C ± 30 menit untuk penyimpanan.

### 3.3.11.3 Pembuatan Gel Agarose

Agarosa dibuat dengan melarutkan 2 g agarose (BioRad) dalam 100 ml 10 tris borate EDTA (*ethylenediaminetetraacid*) (100 g tris base, 27,5 g asam borat, 20 ml 0.5 M EDTA pH 8,0 dalam 1 liter air). Kemudian dipanaskan sampai

mendidih dan larut (bening). Selanjutnya ditambahkan 2  $\mu$ l. *ethidiumbromida* dan dimasukkan dalam pencetak gel yang telah dipasang sisir. Gel agarosa ditunggu sampai memadat (sekitar 30 menit).

#### **3.3.11.4 Elektroforesis**

Gel agarose dimasukkan ke dalam tank elektroforesis yang berisi larutan TBE 0.5x. DNA sampel yang telah dicampur dengan cairan (*loading dye*) dimasukkan ke dalam sumur dengan perbandingan 2 : 1, kemudian *marker* 100bp dimasukkan setelah keseluruhan sampel telah dimasukkan. Elektroda dihubungkan dengan *power supply*, kemudian dinyalakan selama 1 jam (60 menit). Setelah itu, alat elektroforesis dimatikan, kemudian gel dari alat tersebut diambil. Gel dipindahkan ke dalam UV transulaminator, kemudian hasilnya diamati pada komputer.

#### **3.3.11.5 Analisis Data Sekuensing**

Gen 16s rDNA dianalisis secara lengkap di Genetika Science Indonesia untuk memperoleh urutan rantai DNA. Analisis data sekuensing dilakukan dengan menggunakan program software Mega 6 dan Bioedit. Hasil sekuensing dari masing-masing *primer forward* dan *reverse*, selanjutnya digabungkan dengan merubah hasil *sekuensing reverse* untuk pembalikan berpasangan (*reverse complement*). Untuk analisis *sequence alignment*, dilakukan dengan membandingkan sekuens yang diperoleh (*query*) dengan sekuens yang telah ada pada Gen Bank dengan *database searches* NCBI internet site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Ukuran fragmen hasil amplifikasi PCR ditentukan dengan cara dibandingkan antara posisi ukuran penanda DNA (*marker*) dengan ukuran fragmen sampel. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya band pada ukuran 996 bps (Rismawati, 2018).

## V. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

1. Didapatkan 10 isolat yang memiliki aktivitas daya hambat terhadap *S. typhi* dan *S. aureus*, yaitu kode WB-06, WB-08, WB-12, WB-13, PJ-01, PJ-02, PJ-04, PJ-14, PJ-18, PJ-19. Dari 10 isolat bakteri endosimbion potensial, 4 isolat berasal dari perairan Way Belau dengan kode isolat WB-06, WB-08, WB-12, WB-13 dan 6 isolat berasal dari perairan Pagar Jaya dengan kode isolat PJ-01, PJ-02, PJ-04, PJ-14, PJ-18, PJ-19.
2. Aktivitas daya hambat isolat bakteri endosimbion mangrove *Avicennia* sp. yang berasal dari perairan Way Belau dan Pagar Jaya digolongkan sebagai isolat dengan daya hambat sedang hingga kuat.
3. Isolat bakteri endosimbion terpilih merupakan kelompok bakteri *Citromicrobium* sp.

### 5.2 Saran

Pada penelitian ini diperoleh isolat bakteri endosimbion aktif, sehingga berpotensi untuk dikembangkan menjadi produk bionatural. Maka dari itu perlu dilakukan penyelidikan lebih lanjut dan uji berkala untuk mengetahui potensinya sebagai bahan antibiotik baru atau manfaat lainnya seperti bahan antiinflamasi dan antikanker.

## DAFTAR PUSTAKA

- Balserver, S. R dan White.1997. *From Genes to Cells*. John Wiley & Sons. New York. 238 hlm.
- Berg, M. J., Tymoczko, J. L., dan Stryer, L. 2007. *Biochemistry:Sixth Edition*. W.H. Freeman. San Fransisco. 1120 hlm.
- Bhore, S. J., dan Sathisha, G. 2010. Screening of endophytic colonizing bacteria for cytokinin like compounds: crude cell-free broth of endophytic colonizing bacteria is unsuitable in cucumber cotyledon bioassay. *World Journal Agriculture Science*. 6(4) : 345-352.
- Campbel, N. A, Reece, J. B, dan Mitchell, L. G. 2002. *Biologi Edisi ke 5*. Erlangga. Jakarta. 438 hlm.
- Danata, R., dan Yamindago, A. 2014. Analisis aktivitas antibakteri ekstrak daun mangrove *Avicennia marina* dari Kabupaten Trenggalek dan Kabupaten Pasuruan terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Vibrio alginolyticus*. *Jurnal Kelautan*. 7(1) : 12-19.
- Darminto, A. A., dan Dini, I. 2009. Identifikasi senyawa metabolit sekunder potensial menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophyla* dari kulit batang tumbuhan *Avicennia* spp. *Jurnal Chemica*. 10(2) : 92-9.
- Dat, T. T. H., Oanh, P. T. T., Cuong, L. C. V., Anh, L. T., Minh, L. T. H., Ha, H., dan Anh, H. L. T. 2021. Pharmacological properties, volatile organic compounds, and genome sequences of bacterial endophytes from the mangrove plant *Rhizophora apiculata* blume. *Antibiotics*. 10(12) : 1491.
- Entjang. 2003. *Mikrobiologi dan Parasitologi Keperawatan*. PT Citra Aditya Bakti. Bandung. 334 hlm.
- Fatchiyah., Arumingtyas, E. L., Widyarti, dan S., Rahayu, S. 2011. *Biologi Molekular: Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga. Jakarta. 191 hlm.

- Gani, A. K. 2004. *Mikrobiologi Terapan*. Universitas Muhammadiyah. Malang. 194 hlm.
- Jamili, M. A., Hidayat, M. N., dan Hifizah, M. 2014. Uji daya hambat ramuan herbal terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypi*. *Jurnal Ilmu dan Industri Peternakan*. 1(2) : 227-239.
- Jung, H.J., Chan, I.T., Ying, K.J., Song, H.S., Cho, K., Kim, D., Lee, H.W., Lee, J.K., Seo, M.J., Roh, S.W., dan Lee, S.J. 2014. *Citrimicrobium luteum* gen. nov., sp. nov., aerobic anoxygenic phototrophic bacterium isolated from the gut of a sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Journal of Microbiology*. 52(10): 819-824.
- Kemendes RI. 2014. Diare. *Buletin jendela data dan informasi kesehatan*. 5(1):1-3.
- Kusmana, C. Ani. S, Yekti. H, Poppy. O. 2009. *Pemanfaatan jenis pohon mangrove api-api (Avicennia Spp) sebagai bahan pangan dan obat-obatan*. [Seminar Hasil]. Institut Pertanian Bogor. 158 hlm.
- Kusuma, S. A. F. 2010. *Escherichia coli*. Fakultas Farmasi Universitas padjajaran. Jatinangor. 113 hlm.
- Kokpal, V., Miles, D. H., Payne, A. M., dan Chittarwong, V. 1990. Chemical constituents and bioactive compounds from mangrove plants. *Studies in natural products chemistry*. 7(1) : 175-199.
- Lencastre, H., dan Oliveira, D. 2007. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Current Opinion Microbiology*. 10(5): 428-435.
- Ling, X., Lu, C., Huang, Y., Zheng, Z., Su, W., dan Shen, Y. 2007. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(7):1037-1040.
- Liwang, F., Bara, R., Awaloei, H., dan Wuisan. 2014. Uji aktivitas antibakteri jamur endofit akar bakau *Avicennia marina* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Farmakologi*. 2(1) : 1-7.

- Parwata, I. M.O.A. dan Dewi, P.F.S. 2008. Isolasi dan uji aktivitas antibakteri minyak atsiri dari rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.). *Jurnal Kimia*. 2 (2): 100-4.
- Pelczar, M.J.Jr dan Chan E.C.S. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. UI Press. Jakarta. 443 hlm.
- Prihanto, A. A. 2012. Perbandingan aktivitas antibakteri *Penicillium notatum* AT-CC 28089 dengan *Penicillium sp.* R1M yang diisolasi dari mangrove *Sonneratia caseolaris*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 15(1) : 66-70.
- Pringgenies, D., Jumiati, M., dan Ridho, A. 2015. Aktivitas antibakteri ekstrak *nudibranch* polkadot (*Jorunna funebris*)(gastropoda: moluska) terhadap bakteri multidrug resistant (MDR). *Indonesian Journal of Marine Sciences*. 20(4) : 195-206.
- Posangi, J., dan Bara, R. 2015. Uji efek antibakteri jamur endofit pada daun mangrove *Sonneratia alba* terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *e-Biomedic*. 3(1) : 394-398
- Purnobasuki, H. 2004. Potensi mangrove sebagai tanaman obat. *Biota*. 9(1): 125-126.
- Radji, M. 2005. Peranan bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 2(3) : 113-124
- Riedel, S., Morse, S.A., dan Mietzner, T. 2019. *Medical microbiologi Jawetz, Melnick, and Adelberg Ed. 28*. MC. Graw-Hill Education. New York. 877 hlm.
- Rismawati, R. 2018. *Identifikasi Bakteri Endofit Daun Mangrove Api-Api Putih (Avicennia marina) dan Potensinya Menghasilkan Senyawa Anti Mikroba* (Skripsi). Universitas Islam Negeri Alauddin. Makassar. 108 hlm.
- Rohmah, N. S. 2017. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri yang Berpotensi sebagai Agen Bioremediasi Timbal (Pb) dari Lumpur Lapindo*. (Skripsi). Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang. 89 hlm.
- Rossiana, N., Miranti, M., Rahmawati, R., Setyobudi R. H., Nuringtyas T. R., dan Adinurani P. G. 2016. Antibacterial activities of endophytic fungi from



mangrove plants *Rhizophora apiculata* (L.) and *Bruguiera gymnorrhiza* (L.) Lamk. on *Salmonella typhi*. *AIP Conference Proceedings*. 1744(1) : 1-6.

- Sangappa, M., dan Thiagarajan, P. 2015. Combating drug resistant pathogenic bacteria isolated from clinical infections, with silver oxide nanoparticles. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 77(2) : 151.
- Sari, R. P., Roza, dan R. M., Fitmawati. 2015. Aktivitas antibakteri ekstrak daun mahang (*Macaranga triloba* (Muell.) Arg.) terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. *Jurnal Online Mahasiswa FMIPA UNRI*. 2(2) : 1-8.
- Simanjuntak, P., Bustanussalam., Otovina, D.M., Rahayuningsih, M., dan Said, E.G. 2004. Isolasi dan identifikasi artemisinin dari hasil kultivasi mikroba endofit dari tanaman *Artemisia annua*. *Majalah Farmasi Indonesia*. 15(2) : 68-74.
- Simarmata, R., Lekatompessy, S., dan Sukiman, H. 2007. Isolasi mikroba endofitik dari tanaman obat sambung nyawa (*Gymura procumbens*) dan analisis potensinya sebagai antimikroba. *Berk Penel Hayati*. 13(5) : 85-90.
- Sinaga, E., Noverita, dan Fitria, D. 2009. Daya antibakteri jamur endofit yang diisolasi dari daun dan rimpang lengkuas (*Alpinia galangal*). *Jurnal Farmasi Indonesia*. 4(1) : 161-162
- Siswandono dan Bambang, S. 1995. *Kimia Medisinal*. Erlangga. Surabaya. 157 hlm.
- Suheri, F.L., Agus, Z., dan Fitria, I. 2015. Perbandingan uji resistensi bakteri *Staphylococcus aureus* terhadap obat antibiotik ampicilin dan tetrasiklin. *Andalas Dental Journal*. 3(1) : 25-33.
- Susanto, D., Sudrajat, dan R. Ruga. 2012. Studi kandungan bahan aktif tumbuhan meranti merah (*Shorea leprosula* Miq) sebagai sumber senyawa antibakteri. *Mulawarman Scientifie*. 11 (2) : 181-190.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., dan Harper, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*. 67(2) : 257-268.
- Tandi, J. 2017. Kajian kerasionalan penggunaan obat pada kasus demam tifoid di instalasi rawat inap Anutapura Palu. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 6(4) : 184-191.

- Trianto, A., Nirwani, N., Susanti, O., Maesaroh, D. S., dan Radjasa, O. K. 2019. The bioactivity of bacterium and fungi living associate with the sponge *Reniera* sp. against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 20(8) : 2302-2307.
- WHO. 2009. Recommendation on global use of rotavirus vaccine. *Weekly Epidemiological Record*. 2(1) 23-29.
- WHO. 2018. Index of countries/area. *Weekly Epidemiological Record*. 9(3) : 153-172.
- Willyard, C. 2017. Drug-resistant bacteria ranked. *Nature*. 543 : 15.
- Yati, S. J., Sumpono., dan Candra, N. 2018. Potensi aktivitas antioksidan metabolit sekunder dari bakteri endofit pada daun *Moringa Oleifera L.* *Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia*. 2 (1) : 82-87.
- Yurkov, V. V., dan Beatty, J.T. 1998. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbiology*. 62 :695–724
- Yurkov, V.V., Krieger, S., Stackebrandt, E., dan Beatty, J.T. 1999. *Citromicrobium bathyomarinum*, a novel aerobic bacterium isolated from deep sea hydrothermal vent plume waters that contains photosynthetic pigment protein complexes. *Journal of Bacteriology*. 181(15) : 4517 - 4525.
- Yuwono, T. 2005. *Biologi Molekuler*. UGM Press. Yogyakarta. 269 hlm.
- Zinniel, D. K., Lambert, P., dan Harris, N. B. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (5) : 2198–2208.

